Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*) de Lebrija-Santander

Clavijo Diego [1], Portilla Martinez Maghdiel Cecilia [2],Quijano Parra Alfonso[1]

[1].Grupo de Investigación en Quimica.Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona.
[2] Grupo de Investigación Gintal. Facultad de Ingeniería. Departamento de Alimentos. Universidad de Pamplona.

Resumen

El objetivo del proyecto es extraer bromelina de la piña perolera y estudiar su comportamiento cinético. La bromelina es una glicoproteína del grupo de las cisteíno proteasas, actúa sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. En la industria alimentaria, se utiliza como ablandador de carne; hidroliza proteínas solubles de la cerveza. La pulpa de la fruta se llevó a refrigeración (≤ 4ºc), agregando benzoato de sodio, se realizó la extracción con dos solventes: etanol y acetona (75% y 50%) v/v en agua. El extracto se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. La mezcla total se dejo en reposo durante 50 horas manteniendo la temperatura entre 5 y 10ºc y se centrifugo a 4000 rpm por 25 min, se obtuvo un precipitado amarillo oscuro que se dejó secar a temperatura ambiente. Se realizó la cuantificación de proteína, utilizando el método de biuret. Se realizó una electroforesis para encontrar el peso molecular aproximado de la proteína extraída. La eficiencia catalítica de la bromelina se determinó usando caseína como sustrato. Se obtuvo como resultado que, la acetona a una concentración de 75% v/v es la más eficaz para la extracción (243,2mg) que supera aproximadamente en 100mg a la cantidad obtenida con el etanol al 50% v/v (146,0mg). El análisis electroforético muestra que el peso molecular de la bromelina es de 35000 dalton. El comportamiento cinético de la bromelina se ajusta al modelo de michaelis-menten en el cual se determinan la Vmax 3.38e-3 mm/seg y el valor de k_M de 4,19e-3 mm.

Palabras clave: Agente fibrinolítico, Bromelina, Caseína, Electroforesis

Kinetics of bromelain obtained from the pineapple (*Ananas comosus*) from Lebrija-Santander.

Abstract

The target of the project is to extract Bromelain of pineapple (ananas comosus) and study their kinetic behavior. The Bromelain is a glycoprotein of the group of the cysteine proteases, acts on the basic amino acids and aromatic of proteins. In the food industry, is used as meat tenderizer; hydrolyzes soluble proteins of the beer. The pulp of the fruit was cooling (≤ 4 ° c), by adding sodium benzoate, extraction was carried out with two solvents; ethanol and acetone (75 % and 50 %) v/v in water. The extract was centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The extract was then centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The total mixture was left to stand for 50 hours while maintaining the temperature between 5 and 10 °C and centrifuged at 4000 rpm for 25 min, we obtained a dark yellow precipitate that will let it dry at room temperature. The quantification of protein, using the method of biuret. Electrophoresis was performed to find the approximate molecular weight of the extracted protein. The catalytic efficiency of the Bromelain was determined using casein as substrate. It was obtained as a result; the acetone to a concentration of 75% v/v is the most effective for the extraction (243.2 mg)

ISSN 0120-4211 41-49

which is roughly 100mg to the amount obtained with the ethanol at 50% v/v (146.0 mg). The electrophoretic analysis shows that the molecular weight of the Bromelain is 35000 Dalton. The kinetic behavior of Bromelain conforms to the model of michaelis-menten which determines the vmax 3. 38e-3 mm/s and the value of km 4, 19e-3 mm.

Keywords: fibrinolytic agent, Bromelain, Casein, Electrophoresis

Resumo

Cinética bromelina obtidos Perolera abacaxi (Ananas comosus) Lebrija Santander

O objetivo do projeto é extrair a bromelina do abacaxi Perolera e estudar seu comportamento cinética. A bromelaína é um grupo de proteases de cisteína da glicoproteína actuam sobre os aminoácidos básicos e de proteínas aromáticas. Na indústria alimentar, é utilizado como um amaciador de carne; hidrolisado de proteínas solúveis de cerveja. A polpa do fruto levou arrefecimento (≤ 4 ° C), adicionando benzoato de sódio, a extracção foi realizada com dois solventes: etanol e acetona (75% e 50%) v / v em água. O extracto foi centrifugado a 4000 rpm durante 20 min. A mistura total foi deixada repousar durante 50 horas enquanto se mantinha a temperatura entre 5 e 10 ° C e centrifugado a 4000 rpm durante 25 min, obteve-se um precipitado amarelo escuro foi deixada a secar à temperatura ambiente. A quantificação foi realizada por meio da proteína, utilizando o método do biureto. A electroforese foi efectuada para encontrar o peso molecular aproximado da proteína extraída. A eficiência catalítica da bromelaína foi determinada utilizando caseína como substrato. O resultado foi que a concentração de acetona a 75% v / v é o mais eficaz para a extracção (243,2 mg) que excede cerca de 100 mg para o valor obtido com o etanol a 50% v / v (146, 0mg). A análise electroforética mostra que o peso molecular de 35.000 dalton é bromelaína. O comportamento cinético da bromelina encaixa no modelo de Michaelis-Menten, em que Vmax determinar a 3.38e-3 mm / seg e Km valor de 4,19 mm e 3.

Palavras-chave: agente fibrinolítico, bromelina, caseína, Eletroforese

*Para citar este articulo: Clavijo D, Portilla Martinez M.C,Quijano Parra A. Cinética de la bromelina obtenida a partir de la piña perolera (*Ananas Comosus*) de Lebrija-Santander. Bistua.2012.10(2):41-49.

+ Autor para el envio de correspondencia y la solicitud de las separatas: Alfonso Quijano Parra. Laboratorio de Control de Calidad .Universidad de Pamplona. email:quijanoparra@unipamplona.edu.co

Recibido: Septiembre 20 de 2011 Aceptado: Octubre 10 de 2012

Introducciòn

El uso de enzimas como biocatalizadores es una gran opción que debe desarrollar nuestro país, disminuyendo de esta forma el atraso tecnológico en que nos encontramos en el campo de la Enzimología y buscando a la vez las aplicaciones que proporcionen progreso a nivel industrial.Colombia es una de las potencias mundiales en cuanto al cultivo de piña, ya que se encuentra entre los doce países más productores de este fruto alcanzando a producir más de 400.000 toneladas de piña en el 2009 de acuerdo a los registros de la FAO. Sin embargo, a pesar de que nuestro país posee la materia prima suficiente para producir bromelina por su cuenta, la industria colombiana la importa de Europa, mayoritariamente de empresas Alemanas. De hecho, nuestro país carece de producción de Bromelina (Carrera., J.; 2003). La bromelina extiende su uso a la industria cárnica, cervecera, vinícola, cosmética, farmacéutica, eso sin contar las amplias aplicaciones clínicas en la que se ha visto exitosamente aplicada. La Bromelina (Enzyme commission number: E.C. 3.4.22.32) se obtiene del jugo, de la fruta o de los tallos de la piña (*Ananas comosus)*. Es una glicoproteína del grupo de las cisteíno proteasas. Actúa preferencialmente sobre los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. Su pH óptimo se encuentra en el rango de 5 a 8. Tiene baja tolerancia térmica. El enzima se utiliza principalmente como ablandador de carne (tiene buena actividad sobre los tendones y el tejido conectivo rico en elastina) y para hidrolizar proteínas solubles de la cerveza que pudieran precipitar y causar opacidad por el enfriamiento (Carrera., J.; 2003). Estudios de secuenciación de aminoácidos han demostrado que la bromelina debe su actividad a un grupo sulfihidrilo (–SH) propio de una cisteína-25 (Ritonja, A.. et al., 1989), grupo activo que se asemeja a otras cisteíno proteasas como la actinidina y la papaína (Lee, A. et al., 1997). Junto con la papaína (enzima activa de la papaya), la Bromelina tiene una actividad hidrolítica sobre el tejido conectivo con una eficacia del 60%, lo que hace que estos enzimas tengan la capacidad de proporcionar un rápido ablandamiento de la carne de vacuno adulto (Ionescu., et al., 2008). Según Galarza D. (2002), un extracto de corazón de la piña, tiene mayor efecto sobre el ablandamiento de carnes que extractos de cascara y pulpa; esto puede indicar que el corazón de la piña contiene Bromelina de mayor actividad enzimática que la de cualquier otra parte de la fruta. Propiedades similares le permiten actuar eficientemente sobre levaduras, lo que conlleva a que su uso se extienda a la industria panificadora (Moodie, P. 2001) En cuanto a su función en la planta de piña, no se ha encontrado referencias específicas con respecto a este sentido. Al parecer este enzima le da propiedades magníficas al fruto de piña sin ejercer una función importante sobre el fruto en sí (López Lago, I. et al., 1996). En la industria de los alimentos encontramos la aplicación más popular de la bromelina. La capacidad de la bromelina para degradar el material fibroso de los cárnicos es bien conocida. Tanto la cáscara, como la pulpa y el corazón de la piña ejercen un efecto ablandador sobre las carnes, esto es dado por supuesto por la presencia de bromelina en todo el fruto de piña (Galarza, D., 2002). La papaína también presenta actividad ablandadora sobre productos cárnicos, pero se ha demostrado que su eficiencia en este particular aspecto es bastante menor que la eficiencia de la bromelina (Ionescu, A. et al., 2008). En la industria cervecera, la bromelina es usada como aclaradora de tal bebida. Se aplica sobre el producto en la instancia final de su fabricación para que hidrolice ciertos complejos proteicos formados durante la fermentación de la bebida. Resulta entonces un enzima ideal para complementar el proceso de la fabricación de cerveza, ya que

ISSN 0120-4211 41-49

las proteínas hidrolizadas por la bromelina dejan como residuo, polipéptidos que dan sabor a la cerveza y le proporcionan además la capacidad de generar espuma (Oliveira, L., 2001). En cuanto a la industria vinícola Benucci, I. *et al.* (2010), demostraron que la bromelina estabiliza proteínas presentes en el vino blanco e impide que estas precipiten durante la fabricación de la bebida, aspecto que le confiere al producto más claridad y que puede llevar a futuras aplicaciones biotecnológicas de la bromelina en la fabricación de vinos. En la industria de los aceites vegetales se utiliza para refinar aceites y otros productos grasos. Al aplicar la bromelina u otro enzima proteolica como la pepsina o la ya nombrada papaína, estas degradan impurezas del producto y producen por medio de una floculación que los residuos floten sobre el producto, siendo fácil separarlos por decantación o filtración. De esta manera se obtiene un aceite vegetal refinado (Oliveira, L., 2001).

La industria panificadora también está implementando el uso de proteasas en la preparación de sus productos, ya que se reduce considerablemente el tiempo de amasado de grandes cantidades de harina con tan solo una pequeña porción de proteasa. Las proteasas vegetales son la papaína, la bromelina y la ficina. De las tres, la bromelina es la de mayor uso en la industria panificadora. Con base en su actividad por unidad de enzima, la bromelina es comúnmente un poco más cara que la papaína pero la diferencia es insignificante comparada con el aumento en la velocidad de la reacción. La ficina no ha sido usada debido a su alto costo y su disponibilidad intermitente (Moodie, P., 2001).

Se buscó en este estudio extraer la bromelina de la piña y realizarle al producto obtenido una caracterización cinética, esto con el fin de establecer un estudio base que pueda servir como referencia para futuros proyectos de purificación del enzima y posible aplicación en la industria.

Materiales y Metodos

Tratamiento de la materia prima.

El fruto de *Ananas comosus,* fue suministrado por Asofrutales, sede en Lebrija-Santander-Colombia. La fruta fue recibida en estado de madurez, verde y con edades entre un año y un año y medio. Estos frutos presentaron un peso de 3000 y 2590 gr respectivamente. La fruta fue cortada, seleccionando la pulpa de la misma y desmenuzándola suavemente por medio de un macerado hasta obtener la mayor cantidad de extracto posible. Seguidamente se llevó a refrigeración (temperatura ≤ 4ºC), agregando benzoato de sodio (CARLO ERBA REAGENTS) como conservante en relación 0,5g por cada litro de extracto. Pasados quinces días de este tratamiento se pasó al proceso de extracción.

Proceso de extracción.

La extracción del enzima se realizó siguiendo el proceso utilizado por Alonso., A. *et al.*, (2007) con algunas modificaciones. A partir del extracto de piña (*Ananas Comosus)* anteriormente tratado. Se hicieron extracciones con dos solventes: etanol (CARLO ERBA REAGENTS) y acetona (RA CHEMICALS), trabajando en cada caso concentraciones de solvente de 75% y 50% v/v en agua; esto con el fin de realizar una comparación de rendimientos entres estos solventes y estas concentraciones.

Cuantificación proteica del extracto.

Se realizó la cuantificación de proteína del extracto trabajado para la extracción de la misma utilizando el método de Biuret (XXI Congreso de investigación CUAM-AC Mor, 2010). Éste proceso resulta de vital importancia para tener una certeza de la cantidad de proteína presente en el extracto y calcular nuestro rendimiento durante la

ISSN 0120-4211 41-49

extracción teniendo en cuenta la cantidad de precipitado final obtenido. El reactivo de Biuret fue fabricado por el Laboratorio de sustancias y reactivos de la Universidad de Pamplona.

Electroforesis.

La electroforesis realizada, se llevó a cabo con el objetivo de encontrar el peso molecular aproximado de la proteína extraída, y poder realizar una comparación con el registrado en la literatura, más específicamente el reportado por Yamada, F. et al. (1975), el cual tiene un valor de 31000 Dalton. El procedimiento realizado fue un seguimiento de un protocolo establecido por el laboratorio de Biomoléculas de la universidad de Pamplona.

Actividad proteolítica.

El proceso para el estudio de la actividad de la bromelina sobre la caseína se llevó a cabo de la siguiente manera:

· Se trabajó una solución de enzima con una concentración de 4,5e-5 M.

· Se prepararon 100mL de una solución acuosa de caseína α (MERCK CHEMICALS) al 2% en peso, la cual teniendo en cuenta el peso molecular de la caseína es aproximadamente 25.000 Dalton (Boné, J., 2005), nos daría una concentración de 8e-4 M. Lo más relevante para esta medición es que la concentración de sustrato sea significativamente mayor que la concentración de enzima.

· Se preparó además una solución de buffer fosfato 0,1M pH 6 y una solución de ácido acético (CARLO ERBA REAGENTS) 1M.

· Se hicieron pequeñas mezclas de las soluciones de enzima y sustrato en presencia de buffer, 3mL de cada una y 1,5mL de Buffer. Se adicionó a la mezcla 3mL de la

solución de ácido acético 1M con el objetivo de parar la reacción. La adición de este último componente a la primera mezcla se realizó a los 30
segundos, a la segunda a los 60 segundos, y así sucesivamente cada medio minuto hasta completar cuatro minutos para un total de 8 muestras.

· Se usó una mezcla de caseína y buffer como blanco y se midió la absorbancia de cada una de las muestras a 280nm en un espectrofotómetro Genesys 10UV.

· Ya con las medidas anteriores, se determina el tiempo necesario para que la reacción alcance la velocidad máxima, éste se da cuando las medidas de absorbancia empiezan a ser constantes. Dado este tiempo, se procedió a medir la influencia de la concentración del sustrato en la reacción; para esto se trabajó la misma concentración de enzima (4,5e-5 M), ante soluciones acuosas de caseína de concentración 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5% peso a peso. Estas medidas se hacen por supuesto, en presencia del Buffer fosfato 0,1M pH 6 y deteniendo la reacción con ácido acético 1M.

· Con los datos obtenidos se procede a determinar matemáticamente la velocidad de reacción y la constante de Michaelis-Menten del enzima usando el diagrama de Michaelis y algunos métodos de linealización como Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Woolf

Resultados y Discusión

Proceso de extracción.

El extracto de piña después de ser centrifugado por primera vez era mezclado con el solvente de trabajo en relación volumétrica de 1:1. Con el segundo centrifugado se obtuvo el primer precipitado, el cual es descartado. Este precipitado corresponde a azucares de bajo peso molecular que son fácilmente separados de la

ISSN 0120-4211 41-49

pulpa trabajada. Con el nuevo agregado de solvente (esta vez la relación 1:0,5 entre la mezcla y el solvente) se llevó a la conservación en frío por el tiempo indicado. El medio frío en el cual se conservaron las soluciones favoreció la formación del precipitado final, puesto que antes de proceder al centrifugado concluyente ya se observaba un sólido en el fondo de cada recipiente. Con la última centrifugación se obtuvo el precipitado esperado, color amarillo oscuro, el cual posiblemente corresponda a la Bromelina, En la tabla 1 se muestra esquematizado la cantidad de precipitado obtenido para cada solvente trabajado en cada concentración; estas cantidades equivalen a alícuotas de extracto de 100mL.

Como se puede observar de la tabla anterior, la acetona empleada a una concentración de 75% v/v es la más eficaz para la extracción de la bromelina de la piña, produciendo una cantidad (243,2mg) que supera casi en 100mg a la cantidad obtenida con el etanol al 50% v/v (146,0mg) que significó la extracción menos eficiente.

Cuantificación proteica del extracto. A continuación se muestra la figura 1 con los valores de absorbancia obtenidos para cada uno de los patrones de albúmina bovina y la curva de calibración correspondiente:

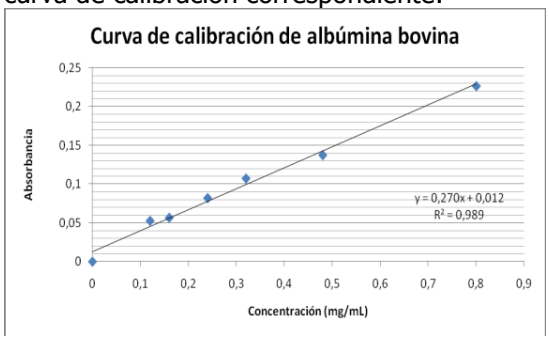


Figura 1: Curva de calibración albúmina bovina para la cuantificación

Con esta curva de calibración obtenemos la ecuación de la recta que servirá para calcular la concentración de cada muestra problema; vemos además que el coeficiente de regresión lineal (R2) está bastante cercano a 1, por lo que la linealidad de la curva de calibración es más que aceptable. La muestra problema, consistente en el extracto diluido se dejó 20 minutos en contacto con el reactivo de Biuret, la medida obtenida se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Absorbancia de muestra problema.

Muestra	**tiempo en contacto con los 3ml de biuret**	**Absorbancia**
1ml extracto +1mL de agua	20 min	0,151

Según la ecuación de la recta obtenida: y = 0,2704x + 0,0127; para cada valor de absorbancia se tendrá una respectiva concentración. Puesto que la absorbancia es la variable correspondiente al eje —y‖, despejamos la ecuación y obtenemos que x= (y-0,0127)/0,2704. El valor de concentración correspondiente a la variable —x‖ y teniendo en cuenta el factor de dilución fue de 2,5573 y una absorbancia de 0,151.

Actividad proteolítica. Al mezclar las soluciones de sustrato y enzima (caseína y bromelina, 3mL de cada solución) en presencia del buffer fosfato (1,5mL de buffer 0,1M pH 6), se detuvo la reacción a intervalos de 30 segundos adicionando un exceso de ácido acético 1M (3mL). La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Genesys 10UV a 280nm. Se usó de blanco una mezcla de solución caseína y buffer (3mL y 1,5mL respectivamente). Los datos obtenidos se muestran en la tabla 4, resaltando que cada muestra se midió por triplicado

De acuerdo a estos datos podemos hallar una velocidad de reacción dividiendo la absorbancia de cada caso entre el tiempo, de

ISSN 0120-4211 41-49

esta forma hallaremos una expresión de velocidad expresada en unidades ópticas por segundo (U.O./seg.)

Con estos datos, graficamos la absorbancia respecto al tiempo(figura 2)

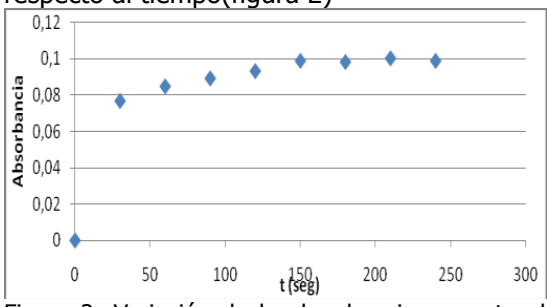


Figura 2: Variación de la absorbancia respecto al tiempo.

Se comprobó seguidamente el pH óptimo de la bromelina, para esto se mezclaron de nuevo 3mL de solución de caseína 8e-4M y 3mL de solución de enzima 4,5e-5 M, en presencia de 1,5mL de buffer fosfato 0,1M de pH variable. Se tomaron las medidas con valores de pH desde 4 hasta 10. Se tomaron medidas de absorbancia a 280nm(figura 3).

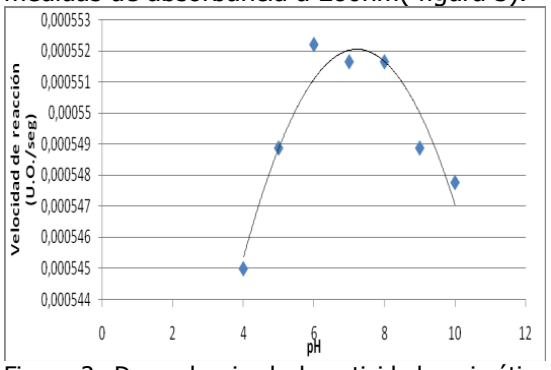
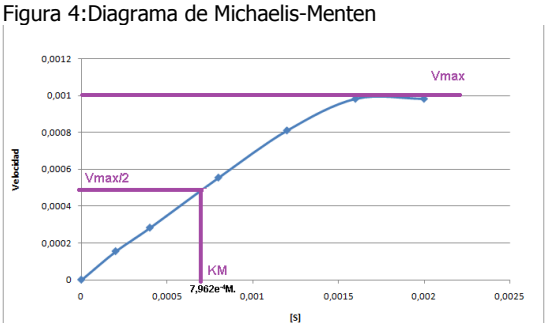


Figura 3: Dependencia de la actividad enzimática de la bromelina respecto del pH.

Como se puede ver en la figura 3, el rango de pH en el que el enzima tiene máximo desempeño es entre 6 y 8. Tomando como base un tiempo de tres minutos y el pH 6, se toman las últimas medidas, dejando actuar el enzima a la misma concentración empleada inicialmente (4,5e-5 M), bajo la acción del mismo buffer y deteniendo de nuevo la reacción con ácido acético 1M. Se puede hallar la velocidad expresada en unidades ópticas por segundo dividiendo la absorbancia entre el tiempo que para este caso equivale a 180 segundos para todas las muestras. Estas velocidades se muestran en la figura 4 donde se grafican las velocidades en función de las concentraciones molares de sustrato; esta gráfica nos llevará al diagrama completo de Michaelis-Menten:

Figura 4:Diagrama de Michaelis-Menten



Esta gráfica nos llevara al diagrama completo de Michaelis-Menten como ya se dijo antes. En primera instancia podemos decir que la velocidad máxima con que actúa la bromelina corresponde aproximadamente a 9,83e-4U.O./seg. Según la cinética de Michaelis, la interpolación al eje de las abscisas del valor correspondiente a la mitad de la velocidad máxima es equivalente a Km (Constante de Michaelis). El valor de Vmax/2 equivale a 4,912e-4 U.O./seg., dato que da como resultado una constante de Michaelis con el valor de 7,962e-4M.

CONCLUSIONES

· La precipitación por centrifugado con solventes orgánicos más específicamente etanol y acetona, resulta ser un método efectivo para extraer la bromelina a partir de extracto de piña (*Ananas Comosus*).

· De los dos solventes empleados para la extracción, la acetona es el solvente más eficaz para este proceso.

· El producto obtenido tiene un peso molecular en el rango de los 30.000 y los 35.000 Dalton, valor que concuerda con el registrado en la literatura.

· Tal como se esperaba, la caseína resultó ser un sustrato por el cual la bromelina presenta gran afinidad.

· El enzima se comporta de buena manera actuando a temperatura ambiente y pH 6.

· La velocidad máxima de reacción alcanzada fue de 9,83e-4 para una concentración de enzima de 4,5e-5 M, y concentraciones de sustrato (caseína) mayores de 1,6e-3M, condiciones de concentración bajo las que el enzima se encuentra saturada, ya que la concentración de sustrato es mucho mayor que la concentración de enzima.

BIBLIOGRAFIA

· ALONSO, A.; GALLARDO, L.; SÁNCHEZ, A.; MONTALVO, C. —Extracción de bromelina a partir de residuos de piña‖. Universidad Politécnica de Puebla, Programa Académico en Ingeniería en Biotecnología. Puebla, Mexico. 2007.

· BENUCCI, I.; LIBURDI, K.; VITTORIA, A.; ESTI, M. —Bromelain from pineapple stem in alcoholic–acidic buffers for wine application‖. Department of food science and technology, University of Tuscia. Food chemistry 24, Pág. 1349-1343. Julio de 2010.

· CARRERA., J.E. —Production and application of industrial enzymes‖. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad del Cauca, Popayán. Febrero de 2003.

· CARVAJAL., L.M. —Producción, transformación y comercialización. Pulpas de frutas industriales‖. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Diciembre del 2000.

· COLAROSSI, A. —Enzimas‖. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Departamento de bioquímica, biología molecular y farmacológica. Disponible en http://www.upch.edu.pe. Citado el 28/12/2011.

· FAOSTAT. Base de datos estadísticos de la FAO (Food and Agriculture Organization). Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Disponible en http://faostat.fao.org. Citado el 27/12/2011.

· FENNEMAN, O. —Química de los alimentos‖. 2ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 2000.

· GALARZA., D.F.; —Efecto ablandador de extractos de cascara, pulpa y corazón de piña en el lomo (Longissimus toracis) y la mano de piedra (Semitendinosus) de res‖. Zamorano. Honduras. Abril de 2002.

· GARCÍA, H. —Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia‖. Laboratorios Beterá. 2000.

· IONESCU., A; APRODU., I; PASCARU., G. —Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat‖. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI – Food Technology, New Series, II (XXXI). Pag. 9-16. Julio de 2008.

· LEE, K.; ALBEE, K.; BERNASCONI, R.; EDMUNDS, T.; —Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases‖. Biochemical Journal 327. Pag. 199-202. 1997.

· LOPEZ LAGO, I.; DÍAZ, J.; MERINO DE CACERES, F. —La bromelina: una proteasa de interés comercial‖. Sociedad Mexicana de nutrición. Ciencia y tecnología alimentaria, Vol. 1, número 002, Pág. 17-22. Reynosa, México, 1996.

· MOODIE, P.; —Enzimas Tradicionales para la Industria Panificadora‖. American Institute of Baking (AIB) de Manhattan, Kansas. 2001.

· MORALES, I. —Electroforesis‖. Universidad nacional autónoma de México. Disponible en http://depa.pquim.unam.mx. Citado el 20/01/2012.

· OIRSA. ORGANISMO INTERNACIONAL REGIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA.‖Manual técnico. Buenas prácticas de cultivo en piña‖. Panamá. octubre de 1999.

· OLIVEIRA, L. —Os avancos do uso da bromelina na área de alimentacao e saúde‖. Departamento de economía doméstica da universidade federal do Rio de Janeiro. Alimentos e nutricao, Vol. 12, Pág. 215-226. Sao Paulo, Brasil, 2001.

· STRYER, L.; TYMOCZKO, J; BERG, M. —Bioquímica‖. 6ª Edición. Editorial Reverté S.A. 2008.

ISSN 0120-4211 41-49

· WABISZCZEWICZ. A. C.; —Análise de viabilidade económica de um processo de extração e purificação da Bromelina do abacaxi‖. Tesis de grado UNICAMP. Faculdad de Ingenieria Química. Universidade estatal de Campinas. São Paulo. Diciembre de 2005.

· XXI CONGRESO DE INVESTIGACIÓN CUAM-ACMOR. —Extracción, cuantificación, identificación y determinación de la actividad enzimática de la bromelina contenida en el tallo del cultivo de Ananas comosus, comúnmente conocido como piña‖. Centro Universitario Anglo Mexicano (CUAM) y Academia de ciencias de Morelos. 2010.

· YAMADA, F.; TAKAHASHI, N.; MURACH, T.1975. —Purification and Characterization of a Proteinase from Pineapple Fruit, Fruit Bromelain‖. Department of Biochemistry, School of Medicine, Nagoya City University.

Tabla 1: Cantidad de precipitado obtenido para cada solvente trabajado

Extracción con etanol		**Extracción con Acetona**	
75% v/v	50% v/v	75% v/v	50% v/v
178,2mg	146,0mg	243,2mg	205,4mg
1,782mg/mL de extracto	1.460mg/mL de extracto	2,432mg/mL de extracto	2,054mg/mL de extracto

Tabla 4: Absorbancias de las mezclas sustrato-enzima.

Muestra	**Tiempo de contacto sin ácido acético**	**Absorbancia**		**Abs. Promedio**
Blanco	--	0	0	0
1	30 seg.	0,076	0,077	0,077	0,0766
2	1 min.	0,085	0,084	0,085	0,0846
3	1 min 30 seg.	0,090	0,088	0,089	0,0890
4	2 min.	0,093	0,093	0,093	0,0930
5	2 min 30 seg.	0,100	0,098	0,098	0,0986
6	3 min.	0,098	0,098	0,098	0,0980
7	3 min 30 seg.	0,100	0,099	0,0101	0,1000
8	4 min.	0,099	0,099	0,098	0,0986